

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problems Mailbox.**

P19977.P04

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : Takaaki SATO et al.

Serial No. : 09/661,305

Group Art Unit : 1645

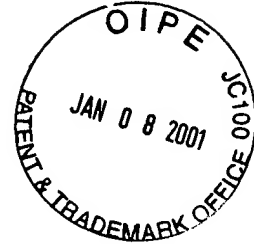
Filed : September 13, 2000

Examiner : Unknown

For : NADE BINDING PROTEINS

**CLAIM OF PRIORITY**

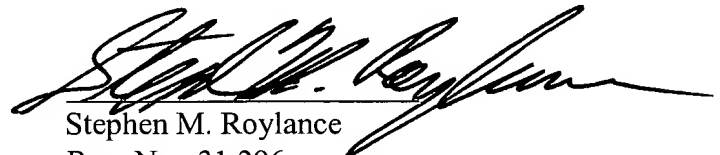
Commissioner of Patents and Trademarks  
Washington, D.C. 20231



Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 11-260947, filed September 14, 1999. As required by 37 C.F.R. 1.55, a certified copy of the Japanese application is being submitted herewith.

Respectfully submitted,  
Takaaki SATO et al.

  
Stephen M. Roylance  
Reg. No. 31,296

January 5, 2001  
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.  
1941 Roland Clarke Place  
Reston, VA 20191  
(703) 716-1191

日 本 国 特 許 庁  
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT



別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 9月14日

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第260947号

出 願 人

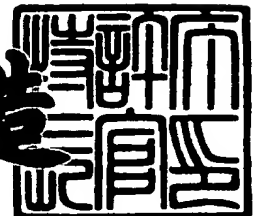
Applicant(s):

理化学研究所  
佐藤 孝明  
入江 新司

2000年 9月 8日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2000-3073011

【書類名】 特許願

【整理番号】 99324M

【提出日】 平成11年 9月14日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 東京都大田区仲池上 2 - 1 - 1 - 3 0 3

【氏名】 佐藤 孝明

【発明者】

【住所又は居所】 茨城県牛久市神谷 2 - 4 1 - 1 5

【氏名】 入江 新司

【特許出願人】

【識別番号】 000006792

【氏名又は名称】 理化学研究所

【特許出願人】

【住所又は居所】 東京都大田区仲池上 2 - 1 - 1 - 3 0 3

【氏名又は名称】 佐藤 孝明

【特許出願人】

【住所又は居所】 茨城県牛久市神谷 2 - 4 1 - 1 5

【氏名又は名称】 入江 新司

【代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 007663

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9607613

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 N A D E 結合蛋白質

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 N A D E ( p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質またはそれをコードする D N A から成る、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニングに用いるための試薬。

【請求項 2】 N A D E ( p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) に結合するアポトーシス関連蛋白質が、14-3-3蛋白質、NIK/HGK蛋白質、P33 ING類縁蛋白質、eIF4G蛋白質及びHuntingtin結合蛋白質 1 から成る群から選択される蛋白質である、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 3】 被験医薬の存在下において、N A D E ( p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質と N A D E との相互作用をモニターすることを含む、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニング法。

【請求項 4】 N A D E ( p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質と N A D E との相互作用に対して影響を与える被験医薬を有効な医薬の候補として選択する、請求項 3 に記載のスクリーニング法。

【請求項 5】 ( a ) N A D E ( p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質と N A D E とを被験医薬の存在下において互いに相互作用させ、

( b ) N A D E ( p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質と N A D E とを被験医薬の非存在下において互いに相互作用させ、

( c ) 上記 ( a ) および ( b ) における相互作用をモニターし、そして

( d ) 上記 ( a ) および ( b ) における相互作用を比較して、相互作用に対して影響を与える被験医薬を有効な医薬の候補として選択する、工程を含む、請求項 3 または 4 に記載のスクリーニング法。

【請求項 6】 請求項 3 から 5 の何れか 1 項に記載のスクリーニング法により選択される、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞のアポトーシスに関連する疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニングに用いるための試薬、上記試薬を用いた医薬のスクリーニング法、並びに上記スクリーニング法により選択される医薬に関する。

【0 0 0 2】

【従来の技術】

細胞死はあらゆる生命現象において重要な役割を担っている。中でも神経系における細胞死の研究は、細胞死の一般的なメカニズムの解明に役立つだけではなく、今日の高齢化社会において今後ますます増大することが予測される脳および神経に関連する疾患の治療および予防に対しても役立つことが期待される。

細胞死と情報伝達経路との関係については現在解明されつつあり、特に、Fas (CD95)やTNFレセプター等に関しては細胞死のシグナル受容体から細胞死の実行蛋白質であるカスパーズに至るまでの情報伝達に関わる様々な分子が単離及び同定されている。

【0 0 0 3】

神経細胞は神経成長因子(NGF)を介して増殖および分化の情報が伝達されるが、最近になってある種の細胞ではNGFによって細胞死が誘導されることが明らかになっている。即ちNGFは、高親和性受容体である  $trkA$  受容体を介して神経細胞の生存を促進する一方、低親和性のNGFレセプターである  $p75^{NTR}$  のみを発現している未成熟神経細胞や成熟した神経膠細胞(例えば、オリゴデンドロサイト)に対しては細胞死を誘導することが報告された。 $p75^{NTR}$  は、その構造的特徴からTNFレセプタースーパーファミリーに属し、TNFレセプターと同様にその分子内にdeathドメインを有する。しかし $p75^{NTR}$  についてはFADDやTRADDのような情報伝達蛋白質の関与は報告されておらず、アポトーシスに至るまでの情報伝達は未だ十分には解明されていない。神経成長因子(NGF)は神経系細胞に作用し、細胞生存

、細胞死あるいは細胞分化シグナルを誘導する。NGFの受容体としては高親和性神経成長因子受容体(trkA)と低親和性神経成長因子受容体(p75<sup>NTR</sup>)の2種類が知られているが、p75<sup>NTR</sup>を介するシグナル伝達機構およびそのシグナル伝達に関わる分子は未だ十分には解明されていない。

【0004】

p75<sup>NTR</sup>を介するシグナル伝達機構の研究が進む中、NADE (p75<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と称される蛋白質が、神経成長因子受容体(p75<sup>NTR</sup>)に結合してアポトーシス誘導および制御に関わる蛋白質としてコロンビア大学で最初に同定された(投稿中)。NADEは全長124アミノ酸、分子量約15kDaの蛋白質をコード(Hum.Mpl.Genet., 8, 611-619, 1999, Bex3として報告されている)し、mRNAレベルでは脳、心臓および肺で発現が高いことが分かっている。

上記のようにNADEは神経成長因子受容体(p75<sup>NTR</sup>)に結合してアポトーシスの誘導および制御に関与していることは判明している。NADEに結合し、NADEを介するアポトーシスに関連する蛋白質が同定されれば、アポトーシスに関連する疾患の治療、予防及び／又は診断のための医薬の開発に有用であると期待されるが、現在までの所、そのような蛋白質は同定されていない。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、NADE結合蛋白質を同定することを解決すべき課題とした。本発明はまた、同定したNADE結合蛋白質とアポトーシス関連疾患との関連を解明することを解決すべき課題とした。本発明はさらにまた、同定したNADE結合蛋白質を用いて、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニング法を提供することを解決すべき課題とした。

【0006】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記課題を解決するために先ず、p75<sup>NTR</sup>/NADEを介したアポトーシスのシグナル伝達経路を明らかにすることを目的として、酵母2-hybridシステムを用いてNADEに結合する種々の蛋白質のcDNAを単離した。その結果



、本発明者らは、細胞内情報伝達にかかわるアダプター分子であると推定されている14-3-3遺伝子並びにNIK(Nck Interacting Kinase)などを含む、NADEと結合しp75<sup>NTR</sup>を介したアポトーシスに関与することが示唆される興味深い幾つかの蛋白質を同定することに成功し、本発明を提供するに至った。

【0007】

即ち、本発明の一側面によれば、NADE (p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質またはそれをコードするDNAから成る、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニングに用いるための試薬が提供される。

NADE (p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) に結合するアポトーシス関連蛋白質は、例えば、14-3-3蛋白質、NIK/HGK蛋白質、P33 ING類縁蛋白質、eIF4G蛋白質及びHuntingtin結合蛋白質1から成る群から選択される蛋白質である。

【0008】

本発明の別の側面によれば、被験医薬の存在下において、NADE (p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質とNADEとの相互作用をモニターすることを含む、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニング法が提供される。

本発明のスクリーニング法の好ましい態様では、NADE (p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質とNADEとの相互作用に対して影響を与える被験医薬が有効な医薬の候補として選択される。

本発明のスクリーニング法の一態様では、(a) NADEと結合するアポトーシス関連蛋白質とNADEとを被験医薬の存在下において互いに相互作用させ、

(b) NADEと結合するアポトーシス関連蛋白質とNADEとを被験医薬の非存在下において互いに相互作用させ、

(c) 上記(a)および(b)における相互作用をモニターし、そして

(d) 上記(a)および(b)における相互作用を比較して、相互作用に対して影響を与える被験医薬を有効な医薬の候補として選択する、  
工程を含む方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のスクリーニング法により選択される、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬が提供される。

【0009】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の実施方法および実施態様について詳細に説明する。

本発明のアポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニングに用いるための試薬は、NADE (p 75<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) に結合するアポトーシス関連蛋白質またはそれをコードするDNAから成ることを特徴とする。

本明細書で言うアポトーシス関連疾患とは、アポトーシスの異常に関連する全ての疾患を包含し、アポトーシス抑制に起因する疾患、アポトーシス促進に起因する疾患、並びに疾患の結果としてアポトーシスが抑制または促進されるような疾患などの全てを含む。

【0010】

アポトーシスが関連する疾患の具体例としてはAIDS、ARC (AIDS関連疾患)、成人T細胞白血病、毛様細胞白血病、脊髄症、呼吸器障害、関節症、ブドウ膜炎等のHIVまたはHTLV-1関連疾患やC型肝炎等のウイルス関連疾患、ガン、全身性エリテマトーデスや慢性関節リウマチ等の膠原病、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、原発性胆汁性肝硬変、突発性血小板減少性紫斑病、自己免疫性溶血性貧血、重症筋無力症、インスリン依存型 (I型) 糖尿病等の自己免疫疾患、骨髓異形成症候群、周期性血小板減少症、再生不良貧血、突発性血小板減少症、汎発性血管内凝固症等の血小板減少を伴う各種疾患、C型、A型、B型、F型等のウイルス性や薬剤性の肝炎および肝硬変の肝疾患、アルツハイマー病、アルツハイマー型老年痴呆症等の痴呆症、脳血管障害、心臓血管障害、神経変性疾患、成人呼吸急迫症候群、感染症、前立腺肥大症、子宮筋腫、気管支喘息、動脈硬化症、各種先天性奇形症、腎炎、老人性白内障、慢性疲労症候群、筋ジストロフィー、末梢神経障害、下痢および赤痢のような胃腸障害、眼障害、肥満、脱毛、ストレスおよび加齢等が挙げられるが、これらに限定されるわけではない。なお、本明細書で言う疾患とは、肥満、脱毛、ストレスおよび加齢等のよ

うな身体的および生理的状态を含む広い概念を包含する。

【0011】

また、アポトーシスに関連する疾患をアポトーシス抑制に起因する疾患とアポトーシス促進に起因する疾患とに分けてより具体的に分類すると、以下のようになる。

アポトーシス抑制に起因する疾患としては、癌（例えば、濾胞性リンパ腫、p53の変異による癌、乳癌、卵巣癌または前立腺癌など）、自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデスまたは免疫関連糸球体腎炎）、またはウイルス感染（例えば、ヘルペスウイルス、アデノウイルスまたはポックスウイルスなど）などが挙げられる。アポトーシス促進に起因する疾患としては、エイズ、神経変性疾患（例えば、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症、色素性網膜炎または小脳変性など）、虚血性疾患（例えば、心筋梗塞または脳卒中など）、骨髓異形成疾患（例えば、再生不良性貧血など）、中毒性疾患（例えば、アルコール性肝炎など）などが挙げられる。

【0012】

N A D E (p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) は、本明細書中で上記した通り、神経成長因子受容体(p 7 5<sup>NTR</sup>)に結合してアポトーシス誘導および制御に関わることが報告されており、そのアミノ酸配列およびそれをコードする塩基配列は既知である(Hum.Mpl.Genet.,8, 611-619, 1999; Bex3として報告されている; この文献の内容は全て引用により本明細書に取り込むものとする)。なお、N A D Eは全長124アミノ酸であり、分子量は約15kDaの蛋白質であり、mRNAレベルでは脳、心臓および肺で発現が高いことが分かっている。

【0013】

本明細書で言うN A D Eに結合するアポトーシス関連蛋白質とは、N A D Eに結合してアポトーシスに関与する全ての蛋白質を意味し、この中には既知の蛋白質のみならず未知の蛋白質も含まれる。本発明におけるアポトーシス関連蛋白質は、好ましくは、p 7 5<sup>NTR</sup>/N A D E複合体を経由する細胞内シグナル伝達経路において、N A D Eとの相互作用の異常がアポトーシス関連疾患と何らかの関係がある蛋白質である。

そのようなアポトーシス関連蛋白質の具体例としては、以下に挙げるものがあるが、これらに限定されるわけではない。なお、括弧書の中にこれらの蛋白質に関する参考文献を記載したが、これらの文献に記載の内容は全て引用により本明細書に取り込むものとする。

【0014】

(1) 14-3-3蛋白質 (Ichimura, T他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:7084-7088, 1988; Isobe, T他、J. Mol. Biol., 217:125-132, 1991; 並びに実験医学第13巻第6号(増刊) 1995, p.120-125およびこの中に記載の引用文献)。

機能としては、EGF(線維芽細胞増殖因子)、PDGF(血小板由来増殖因子)、インスリンなどの受容体チロシンキナーゼに連結した増殖・分化シグナルと、 $Ca^{2+}$ -カルモジュリン依存性蛋白質キナーゼII、 $Ca^{2+}$ -リン脂質依存性蛋白質キナーゼを軸とした $Ca^{2+}$ シグナルの調節を中心に、血液凝固シグナルや、 $H^+$ 輸送系、Gboxエレメントを介する転写調節など、核内外のシグナル伝達系での機能が推定されている。

【0015】

(2) NIK/HGK蛋白質 (Yi-Chi Su他、The EMBO Journal, Vol.16, No.6, pp. 1279-1290, 1997; 並びに Zhengbin Yao他、The Journal of Biological Chemistry, Vol.274, No.4, pp.2118-2125, 1999)

NIK/HGKはMAPKカスケードの上流因子MAPKKKKとして機能しておりMEKKやTAKのリン酸化を介してJNKあるいはP38MAPKの活性制御を行っている。近年、アポトーシス制御シグナル機構にJNKが関与しているという報告が複数のグループによってなされており、NGF/ $p75^{NTR}$ によって誘導されるアポトーシスにNIK/HGKが関与していることが示唆される。

【0016】

(3) P33 ING1蛋白質 (Moshe Oren, Nature, Vol.391, p.233-234, 1998; Igor Garkavtseve他、Nature, Vol.391, p.295-298, 1998; 並びにCaren C. Helbing他、Cancer Research 57, 1255-1258, 1997)

P33ING1は癌抑制遺伝子の候補である。P33ING1はp53依存性転写活性化を調節することによって、細胞増殖の抑制にp53と共同して働くp53シグナル伝達経路を

構成する成分であると考えられる。即ち、ING1を通し、細胞周期に関係したアポトーシスが制御されている可能性がある。

【0017】

(4) eIF4G蛋白質 (Imataka, H. 他、EMBO Journal, 16, 817-825, 1997; Yamanka, S. 他、Genes & Dev., 11: 321-333, 1997; 並びに実験医学第17巻第7号(5月号) 1999およびその中に記載された引用文献)

eIF4Gは翻訳開始因子であり、mRNAの3' 及び5' 末端に結合する蛋白質(PABP; ポリA結合蛋白質, eIF4E; CAP構造に結合)と結合することによりmRNAを捉えリボソームを呼び込み翻訳開始へ導く。即ち、NADE/eIF4Gを介した翻訳制御がアポトーシスを調節している可能性がある。

【0018】

(5) Huntingtin結合蛋白質1 (HIP1) (Michael A. Kalchman 他、Nature Genetics, Vol.16, p.44-p.53, 1997)

大脳、小脳で特異的に発現しており(骨格筋、心臓、精巣、腎臓、脾臓、肝臓、肺にはHIP1蛋白質なし)、ハンチントン舞踏病の原因遺伝子産物であるhuntingtinに結合する。HIP1は、酵母*S.cerevisiae*のSla2p, Sla2c (cytoskeletal-associated protein)や*C.elegans*のZK370.3と相同性があり、細胞骨格形成の制御によるアポトーシス調節の関与が示唆される。

【0019】

本発明で用いるNADE (p75<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質の起源は何ら限定されず、天然由来の蛋白質、組み換え蛋白質または化学合成蛋白質の何れでもよい。

また、本発明で用いるNADEと結合するアポトーシス関連蛋白質は、スクリーニング用試薬として好適に用いることができるように、その後の検出などのための反応性物質や標識などを付加した形態のものでもよい。

【0020】

さらに、本発明の試薬としては、NADEと結合するアポトーシス関連蛋白質のみならず、それをコードするDNAを用いてもよい。即ち、アポトーシス関連蛋白質をコードするDNAを好適な発現ベクターに組み込むことによって調製し

た組み換えベクターを細胞にトランスフェクションすることによって細胞内でアポトーシス関連蛋白質を発現させ、かくして発現された蛋白質とN A D Eとの相互作用についてアッセイを行うことによってアポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニングを行うこともできる。アポトーシス関連蛋白質をコードするDNAを発現するための発現ベクターは当該DNAの種類などに応じて当業者ならば適宜選択することができる。一般的には、発現ベクターには、適当なプロモーター配列と、必要に応じて適当な選択マーカー遺伝子などが含まれている。

#### 【0021】

本発明はまた、被験医薬の存在下において、N A D Eと結合するアポトーシス関連蛋白質とN A D Eとの相互作用をモニターすることを含む、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニング法に関する。

N A D Eと結合するアポトーシス関連蛋白質とN A D Eとの相互作用とは、蛋白質間相互作用である。このような蛋白質間相互作用をモニターする方法は、当該技術分野で公知であり、当業者ならば任意の方法を適宜使用することができる。例えば、以下に挙げる方法を使用することができる。

#### 【0022】

##### (1) 共沈法（免疫沈降法）

共沈の方法は公知であり、例えば以下の実施例にも記載されている。例えば、各濃度の被験医薬の存在下において本発明の試薬とN A D Eを適当な溶液中で混合し相互作用させた後、試薬とN A D Eとの複合体を免疫沈降させる。次いで、沈降物をイムノブロットした後、複合体を検出するのに適した抗体（抗N A D E抗体などを一次抗体として使用し、さらに一次抗体と反応する二次抗体を用いて検出を行うことができる）を用いて検出することにより、N A D Eと結合するアポトーシス関連蛋白質とN A D Eとの相互作用に及ぼす被験医薬の影響を調べることができる。なお、相互作用に対する被験医薬の影響は直接的なものでも間接的なものでもよく、影響の態様は何ら限定されない。

##### (2) E L I S A法

担体（プレート、ナイロンフィルター、ニトロセルロースフィルター等）にN

N A D E 蛋白質を固定し、標識した N A D E 結合蛋白質との結合阻害あるいは促進をモニターすることができる。あるいは逆に N A D E 結合蛋白質をプレートに固定しておき、標識した N A D E 蛋白質との結合阻害あるいは促進をモニターしてもよい。スクリーニングする化合物としてはケミカルライブラリー等を使用することができる。

#### 【0023】

##### (3) 酵母2-hybrid系の応用

N A D E 及び N A D E 結合蛋白質を酵母内で同時に発現させておき、その細胞に c D N A あるいはペプチドライブラリーを導入することにより、N A D E / N A D E 結合蛋白質の相互作用に影響を与えるような c D N A を保持する酵母クローンをスクリーニングする。得られたアミノ酸配列から低分子化合物をデザインすることができる。

##### (4) 動物細胞の利用

C A T や ル シ フ ェ ラ ー ゼ の よ う な 動物細胞での活性測定が容易なレポーター遺伝子を利用して、N A D E 及び N A D E 結合蛋白質の相互作用が存在する場合に活性を有する系（細胞）を構築する。この細胞に c D N A、ペプチドライブラリーあるいは細胞膜透過性の高い低分子ケミカルライブラリーを与え、N A D E / N A D E 結合蛋白質の相互作用に影響を与えるような物質をレポーター遺伝子発現の変化としてスクリーニングする。

#### 【0024】

本発明のスクリーニング法で使用する N A D E と結合するアポトーシス関連蛋白質並びに N A D E は、蛋白質の形態でアッセイ系に供給してもよいし、あるいは発現ベクター等に組み込んだ D N A の形態でアッセイ系に供給し、アッセイ系内で発現させたものでもよい。

また、蛋白質の形態で供給する場合でも D N A の形態で供給する場合でも、N A D E と結合するアポトーシス関連蛋白質と N A D E を供給する順序は限定されず、同時に供給してもよいし、何れかを先に供給してもよい。

#### 【0025】

N A D E と結合するアポトーシス関連蛋白質と N A D E との相互作用に対する

被験医薬の影響は、被験医薬を添加しないコントロールと比較して測定することが好ましい。また、被験医薬の添加量を変化させて相互作用への影響が添加量に依存しているかどうかを調べたり、あるいは継続的にアッセイを行い蛋白質間相互作用に対する影響の経時的変化を調べるのが好ましい。

#### 【0026】

被験医薬が、N A D E と結合するアポトーシス関連蛋白質と N A D E との相互作用に対して影響（即ち、相互作用を増進させる場合と低下させる場合がある；なお、この何れかを選択すべきかは、用いたアポトーシス関連蛋白質の種類と、被験医薬の投与の対象となる疾患の種類などに依存する。）を有していれば、当該被験医薬は有効な医薬の候補として選択することができ、こうして選択された医薬は、更なる試験に付して薬効を確認することができる。

#### 【0027】

本発明はさらに、上記したスクリーニング法により選択される、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬に関する。

被験医薬の種類は特に限定されないが、例えば、サイトカイン類、小分子医薬、（細胞透過性小分子医薬などを含む）、ホルモン、インターロイキンとレクチンと他の刺激剤との組み合わせ、特異性抗体、ペプチド模倣物、アンチセンスオリゴヌクレオチド、および細胞機能またはタンパク質発現を改変する他の医薬のような任意の医薬などを挙げることができる。

#### 【0028】

本発明はさらに、N A D E (p 7 5<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質の細胞内における発現または量を調節する物質を有効成分とするアポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬に関する。このような医薬としては、当該アポトーシス関連蛋白質の遺伝子の転写または翻訳を調節する物質、当該遺伝子のアンチセンスオリゴヌクレオチド、当該蛋白質に対する抗体（特にはモノクローナル抗体）などが挙げられる。

#### 【0029】

#### 【実施例】

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によ



って限定されることはない。

#### 実施例 1 : 酵母2-hybrid法を用いたN A D E結合蛋白質分子の同定

Dr.Stan Horenberg等により改良された酵母2-hybrid法 (Cell,74,205-214,1993) を用いて、N A D E結合蛋白質分子の同定を実施した。L 4 0 酵母細胞 (MAT a his3 trp1 leu2 ade2 LYZ2::lexA-HIS3 URA3::lexA-lacZ) 内において、DNA結合能をもつlexA蛋白質と、転写活性をもつVP16はそれぞれ単独では転写活性は保有しない。しかし各ドメインに融合する蛋白質間の結合により生じた蛋白質複合体はレポーター遺伝子の転写を誘導する。すなわちlexAと蛋白質「X」の融合標的蛋白質とVP16と蛋白質「Y」の融合蛋白質が、XとYの結合を介して複合体形成した場合にのみレポーター遺伝子であるHIS3およびLacZの転写が上昇する。lexA-X融合蛋白質とVP16-Y融合蛋白質を保持し、レポーター遺伝子の転写が上昇した酵母細胞は、ヒスチジン要求性の回復と $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性測定により選択することができる。

本システムを利用して、我々はN A D E-lexA融合蛋白質を標的蛋白質とし、V P16融合マウス9日胚由来cDNAライブラリーのスクリーニングを実施した。

#### 【0030】

(1) N A D E遺伝子を有する組み換えベクターによる酵母L 4 0の形質転換

組み換えベクター調製に用いる全長N A D E遺伝子をPCR法により、鋳型DNAとしてマウス胎児cDNA (クローンテック社) を、プライマーとしてATGG ATCCTCATGGCCAATGTCCACCAGGおよびATCTCGAGTCAAGGCATAAGGCAGAATTCATCを用いて増幅および単離した。得られたPCR産物をBamHIおよびXhoIで制限酵素処理し、BamHIおよびSalIで制限酵素処理しSAP処理した発現ベクターpBTM116 (Bartel and Fields) とライゲーションして、組み換えベクターpBTM116-N A D Eを調製した。

#### 【0031】

次に、この組み換えベクターpBTM116-N A D Eを用いて酵母L 4 0細胞を形質転換した。50ml YPD培地中で酵母L 4 0株を30℃で一晩培養した。形質転換する当日に、100mlのYPD培地が入った500mlのフラスコに10mlの培養液を植菌し、30℃で0.3~0.5のOD<sub>600</sub>になるまで4~6時

間培養した。次いで、培養液を室温で3000rpmで5分間遠心し、上清を捨てた後、蒸留水で3回洗浄し、細胞ペレットを4mlの0.1Mリチウムアセテート/1×TEに懸濁し、室温で10分間静置した。これをコンピテント細胞として用いた。

#### 【0032】

1μgの組換えベクターpBTM116-NADEと100μgの変性サケ精子DNAをエッペンドルフチューブに入れボルテックスし、これに100μlのコンピテント細胞液を添加し、軽く攪拌した。さらに600μlの40%PEG3350/0.1Mリチウムアセテート/1×TEをエッペンドルフチューブに入れ、ボルテックスし30℃で30分間静置した。70μlのDMSOを添加し、攪拌した後、攪拌しながら42℃で15分間処理し、その後、冷却した。チューブを15,000rpmで5秒間遠心し、上清を捨て、細胞ペレットを500μlのTEに懸濁した。

上記細胞懸濁液をトリプトファンを含まない最小培地（SD培地）のプレートにスプレッドし、30℃で培養し、組換えベクターpBTM116-NADEを有する形質転換体を取得した。

#### 【0033】

また、形質転換体におけるNADEの発現を以下の方法により確認した。まず、培養液を3000rpmで室温で10分間遠心し、冷蒸留水でペレットを洗浄し、3000rpmで室温で10分間遠心した。ペレットを1mlの冷蒸留水に懸濁し、1.5mlのチューブに移し、3000rpmで4℃で5分間遠心した。ペレットに2倍容量の完全クラッキング緩衝液（8M尿素、5%SDS、40mMのTris-HCl（pH6.8）、0.1mMのEDTA、145mMの2-メルカプトエタノール、1mMのPMSF、2μg/mlのアプロチニン、50μg/mlのロイペプチン、2mMのベンズアミジン、2μg/mlのペプスタチンA）（200μl）を添加し、ボルテックスし、スパーテルを用いて150μlのビーズを添加した。70℃で10分間放置した後、14,000rpmで4℃で5分間遠心し、上清を採取し、SDS-PAGE（12.5%のポリアクリルアミドゲル）に付した。一次抗体として抗LexAウサギポリクローナル抗体IgG

を使用したウエスタンブロッティング法により 43 kDa の位置にバンドが示されたことにより NADE 蛋白質の発現が確認された。

【0034】

(2) マウス胚由来 cDNA ライブラリーによる酵母 L40 の形質転換

上記(1)で得た組み換えベクター pBTM116-NADE を保持する酵母 L40 を、3 L のバッフル付フラスコ中の 1 L の SD-Trip 培地において 0.2 程度の OD<sub>600</sub> で 30℃ で培養を開始し、0.4~0.6 の OD<sub>600</sub> に達するまで培養した。

培養液を 50 ml のチューブに移し、室温で 3000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨てた後、蒸留水で 3 回洗浄し、細胞ペレットを 8 ml の 0.1 M リチウムアセテート/TE に懸濁し、室温で 10 分間静置した。これをコンピテント細胞として用いた。

【0035】

一方、pVP16 ベクター (クローンテック社) を用いて作製したマウス 9 日胚由来 cDNA ライブラリー 100 µg と変性サケ精子 DNA 20 mg (10 mg/ml の溶液を 2 ml) を 50 ml のファルコンチューブに入れ、ボルテックスでよく混合した。これに 8 ml のコンピテント細胞液を添加し、軽く攪拌した。さらに 60 ml の 40% PEG 3350/0.1 M リチウムアセテート/TE を入れた 500 ml のフラスコに上記コンピテント細胞と DNA の混合液を添加し、よく攪拌し、30℃ で 30 分震盪培養した。7 ml の DMSO を加え、42℃ で 15 分間処理した (5 分毎に攪拌) 後、冷却した。

250 ml のチューブに細胞液を移し、3000 rpm で 5 分間遠心し、上清を捨て、細胞ペレットを 500 ml の滅菌蒸留水で 1 回洗浄した。

【0036】

3000 rpm で 5 分間遠心後、上清を捨て、50 ml の YPD 培地に細胞ペレットを懸濁し、500 ml の YPD が入った 2 L のフラスコ 2 本に 25 ml ずつ植菌し、30℃ で 1 時間震盪培養した。3000 rpm で室温で 5 分遠心し、上清を捨てた後、同量の滅菌蒸留水で合計 4 回細胞ペレットを洗浄した。

細胞ペレットを 4.5 ml の滅菌蒸留水に懸濁させ、0.5 ml ずつ、SD 培

地 (-Trp、-Leu、-His) のプレート (150×15 mm) に 150  $\mu$ l ずつスプレッドし、30℃で3～5日間培養した。この際、形質転換効率を測定するために適当量に希釈した細胞ペレットを、SD最小培地 (-Trp、-Leu) にスプレッドした。形成されたコロニーとして全部で455個のクローンを単離し、形質転換効率は  $7.7 \times 10^7$  であった。

【0037】

(3)  $\beta$ -gal アッセイ

形質転換されたコロニーをSD最小培地 (-Trp、-Leu) の小型プレート上においたナイロンメンブレンにつまようじで植菌し、2～3日程30℃で培養した。メンブレンをプレートからとりはがし、予め液体窒素で冷却しておいたアルミホイルのフローター上 (約30秒) にのせ、30秒間凍らした。その後、メンブレンをフローターと一緒に液体チッソにしみこませ、30秒間凍らした。メンブレンを液体窒素からピンセットを使って取り出し、3MMの濾紙上にコロニーが上になるように置き融解させた。

小型プレートの大きさにあうように3MM濾紙を円型に切り、50  $\mu$ l の 25 mg/ml X-gal を含む 3.2 ml の Z-バッファー (60 mM の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 、40 mM の  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、10 mM の KCl、1 mM の  $\text{MgSO}_4$ ) をしみ込ませた。その上に融解したメンブレンを空気の泡が残らないようにピンセットを使ってのせ、30分間、37℃でインキュベーションした。その後、1、2、4、8 および 24 時間と発色を観察した。

その結果、全部で435個のクローンの発色が確認された。

【0038】

(4) Curing テスト

bait プラスミド (pBTM116-NADE) を L40 株の陽性クローンから取り除くために、SD液体培地 (-Leu) で1～2日間培養し、同じアミノ酸が入った小型プレート培地でシングルコロニーを単離した。その後、SD培地 (-Trp、-Leu) にレプリカし、-Trp培地で生育しないコロニーを得た。

その結果、全部で339個のクローンが単離された。

【0039】

## (5) mating テスト

pBTM116-NADE を失い、ライブラリープラスミドのみを保持するクローンと、予め pBTM116-NADE、pBTM116-LaminC、pBTM116-CD40、pBTM116-Fas、pBTM116-Ras、pBTM116-TNFRII で各々形質転換した mating 用酵母 (NA87-11A、Mat $\alpha$  leu2 his3 trp1 pho3 pho5) をメーティングさせた。pBTM116-NADE を失い、ライブラリープラスミドのみを保持する酵母クローンを SD 液体培地 (-Leu) で、pBTM116-NADE/NA87-11A、pBTM116-LaminC/NA87-11A、pBTM116-CD40/NA87-11A、pBTM116-Fas/NA87-11A、pBTM116-Ras/NA87-11A、pBTM116-TNFRII/NA87-11A を SD 液体培地 (-Trp) でそれぞれ OD<sub>600</sub> > 1.0 になるまで 30℃ で震盪培養し、96 ウェルプレートを用いて 100  $\mu$ l の YPD 中で 30℃ で 4~8 時間両クローンの mating を行った。

## 【0040】

mating 後、各々のクローンを SD プレート (-Trp、-Leu) 上に 5~10  $\mu$ l ずつスポットし、2 日間ほど 30℃ で培養した。さらに得られたクローンが NADE に特異的に結合する蛋白質を発現するかどうかを、His と  $\beta$ -gal の 2 つのリポーター遺伝子で確認した。

その結果、NADE に特異的に結合する蛋白質を発現し、かつ His 選択と  $\beta$ -gal アッセイで陽性と判定されたクローンとして全部で 105 個のクローンが得られた。

## 【0041】

### 実施例 2：酵母 2-hybrid 法を用いて同定された NADE 結合蛋白質分子の構造分析

実施例 1 で取得した陽性クローンのうちの 96 クローンについて、酵母が保持するライブラリー由来の cDNA を回収し、その塩基配列を決定した。

まず、酵母培養液を 3000 rpm で 5 分遠心し、上清を捨て、500  $\mu$ l の水を加え、ペレットを懸濁し、1.5 ml のチューブに移した。15000 rpm

mで5秒遠心し上清を捨てた。SZB水溶液（1Mソルビトール、100 mMクエン酸ナトリウム、並びに50 mMのEDTA、 $8 \mu\text{l}/\text{ml}$ の2-メルカプトエタノール；さらにZYMOLYASE(生化学工業、Code12049; Lot No 10971)  $3 \text{ mg}/\text{ml}$ を使用直前に添加)  $150 \mu\text{l}$ を添加して懸濁し、5分毎に転倒混和しながら30℃で30分間静置した。SDS/TE溶液（0.1Mトリス塩酸（pH 8.0）、2% SDS） $150 \mu\text{l}$ を添加し、ボルテックスし、65℃で5分間処理した。5Mの酢酸カリウムを $150 \mu\text{l}$ 添加し、ボルテックスし、氷上で30分間静置した。 $15000 \text{ rpm}$ で4℃で15分間遠心し、上清 $300 \mu\text{l}$ だけ新しい1.5 mlのチューブに移し、10Mの酢酸アンモニウム $100 \mu\text{l}$ とエタノールを1 ml加え-20℃で10分間静置した。再度遠心と静置する操作を二回繰り返し、最後に70%エタノールをペレットに加え洗浄した後、 $30 \mu\text{l}$ の水に溶解し、プラスミド溶液とした。

## 【0042】

上記プラスミドを大腸菌にエレクトロポレーション法（大腸菌とプラスミドの混合液を1.7 kV、 $25 \mu\text{F}$ 、200オームでパルスした後、37℃で1時間培養）により形質転換し、得られた形質転換体からアルカリ法によりプラスミドを回収した。回収したプラスミドを用いて常法により実施例1で得られた陽性クローンの塩基配列を決定し、データベースとの比較を行った。データベース（NCBI's sequence similarity tool）との比較の結果、以下の塩基配列と相同性を有するクローンが同定された。括弧内の数字は獲得クローンの数を示す。

## 【0043】

Mus 14-3-3 eta (1)

mus 14-3-3 beta (1)

Mus 14-3-3 epsilon (4)

NIK (Nck interacting kinase) (4)

Mus EST AA794707 (5)

Hum Desmoplakin I (3)

Hum eIF4G (3)

Mus nuclear autoantigen sperm protein (3)

hum KIAA 0192 (3)  
 Mus M2 type pyruvate kinase (3)  
 Hum TSC1 (2)  
 Mus laminin B1 (2)  
 Mus EST AA499218 (2)  
 Hum protein regulating cytokinesis 1(2)  
 【 0 0 4 4 】  
 Mus NADE (1)  
 Mus endophilin II (1)  
 Hum Huntingtin binding protein 1(HIP1) (1)  
 Rat protein tyrosine phosphatase TD14 (1)  
 Mus CAG repeat mRNA partial U80888 (1)  
 mus TRF1 (1)  
 Hum PTAC97 (1)  
 Mus putative transcription factor (1)  
 Hum rab3-GAP regulatory domain (1)  
 Hum Ran GTP B.P. (1)  
 Hum RB B.P.II (1)  
 Mus ret finger protein 1(REF1) (1)  
 Set alpha isoform (1)  
 【 0 0 4 5 】  
 Hum splicing factor SRp55-3 (1)  
 Hum SW1/SNF complex 170kD subunit (1)  
 Hum tax 1 B.P. (1)  
 Mus casein kinase II (1)  
 Mus cdr 2 (1)  
 Mus fat facets homologue (Fam) (1)  
 B.Tra guanine nucleotide exchanging P. (1)  
 Mus KIF3 (1)

Hum Lowe's oculocerebrorenal syndrome (OCRL) (1)  
 Hum LZTR-1 leucine zipper,ttk DiGeorge (1)  
 Mus Mov-34 (1)  
 Ratt myosin heavy chain (1)  
 Hum EF1 delta leu.zip contain G-nucleotide ex.(1)  
 Hum auto antigen (1)  
 Rat beta adaptin mRNA, complete cds (1)  
 Rat beta spectrin (1)  
 Hum DOCK 180 (1)  
 Hum Dynactin 50k subunit (1)  
 hum EF1 delta (1)  
 myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-kinase MRCK-beta(1)

【 0 0 4 6 】

Mus EST AA967322 (1)  
 mus EST AU035250 (1)  
 Mus EST C85116 (1)  
 Mus EST W75029 (1)  
 Mus EST (1)  
 Mus EST 032345 (1)  
 Mus EST AA207590 (1)  
 Mus EST AA277260 (1)  
 Mus EST AA413882 (1)  
 Mus EST AA717789 (1)  
 mus EST AA755361 (1)  
 Hum KIAA0161 (1)  
 Hum KIAA0181 (1)  
 Hum KIAA0554/CDC42 B.P. (1)  
 Unknown (7)

【 0 0 4 7 】



取得したクローンのうち、特に重要と考えられる蛋白質分子としては、以下の5種類の蛋白質が挙げられる。これら蛋白質の情報を以下に記載する。

(1) 14-3-3蛋白質

a) 14-3-3 $\epsilon$  (255アミノ酸)

モノアイソトニック分子量=29,155.4130

b) 14-3-3 $\beta$  (246アミノ酸)

モノアイソトニック分子量=28,078.8437

c) 14-3-3 $\eta$  (246アミノ酸)

モノアイソトニック分子量=28,194.0212

14-3-3蛋白質は、ヘテロまたはホモ2量体として存在し、以下に示すように様々な蛋白質に結合し、活性の制御、蛋白質極在の制御に関与すると考えられている。

(14-3-3の結合が報告されている蛋白質)

c-Raf-1/A-Raf/Cdc25a/Cdc25b/Cdc25c/PKC-epsilon/PCTAIRE-2/  
Tyr hydroxylase/ Tryp hydroxylase/A20/BAD/Cb1/PKC gamma/  
IRS-1/BCR/K8kwratin/c-fes

【0048】

(2) NIK(Nck interacting kinase[マウス]/HGK[ヒト]) (1,233アミノ酸)

分子量=140,515

NIK/HGKはMAPKカスケードの上流因子MAPKKKKとして機能しておりMEKKやTAKのリン酸化を介してJNKあるいはP38MAPKの活性制御を行っている。近年、アポトーシス制御シグナル機構にJNKが関与しているという報告が複数のグループによってなされており、NGF/p75<sup>NTR</sup>によって誘導されるアポトーシスにNIK/HGKが関与していることが示唆される。

【0049】

(3) P33ING1 (294アミノ酸)

分子量=33,273.84

P33ING1は13q34にマップされる癌抑制遺伝子の候補であり、老化線維芽細胞で発現が高い。p53に結合することでp21WAF1の転写誘導に関わり、高発現によりG

1 arrestが誘導される。即ち、ING1を通し、細胞周期に関係したアポトーシスが制御されている可能性がある。取得したクローンはp33INGと相同性を示す類縁クローンであった。

【0050】

(4) eIF4G(翻訳開始因子)(1,560アミノ酸)

eIF4GはmRNAの3' 及び5' 末端に結合する蛋白質(PABP;ポリA結合蛋白質, eIF4E;CAP構造に結合)と結合することによりmRNAを捉えリボソームを呼び込み翻訳開始へ導く。即ち、NADE/eIF4Gを通し、翻訳制御がアポトーシスを調節している可能性がある。

【0051】

(5) Huntingtin binding protein 1(HIP1)(914アミノ酸)

分子量=102,317.03

大脳、小脳で特異的に発現しており(骨格筋、心臓、精巣、腎臓、脾臓、肝臓、肺にはHIP1蛋白質なし)、ハンチントン舞踏病の原因遺伝子産物であるhuntingtinに結合する。HIP1は、酵母*S.cerevisiae*のSla2p, Sla2c (cytoskeletal-associated protein)や*C.elegans*のZK370.3と相同性があり、細胞骨格形成の制御によるアポトーシス調節の関与が示唆される。

【0052】

### 実施例3：NADE蛋白質と14-3-3蛋白質とのインビボにおける結合

ほ乳類培養細胞で発現させたNADE蛋白質が14-3-3と結合することを免疫沈降実験により確認した。

先ず、ヒト胎児腎臓由来293T細胞に、500 $\mu$ lのOptiMEMと10 $\mu$ lの1mg/mlのNADE cDNAを含む発現ベクター (mNADE/pcDNA3.1(-) Hismycl) の混合液Aと500 $\mu$ lのOptiMEMと30 $\mu$ lのリボフェクトアミン(BRL社)との混合液Bとを混合してさらに4mlのOptiMEMを加えて調製した混合液を滴下添加し、37℃で4時間5%CO<sub>2</sub>下で培養した。溶液を除去し、完全培地10mlを加え、37℃5%CO<sub>2</sub>下で培養し、細胞をトランスフェクションした。

【0053】

トランスフェクション48時間後に細胞を回収し、10mlのPBSで2回、1mlのPBSで1回洗浄し、ライシス緩衝液(150mMのNaCl、1%Triton X100、20mMのトリス塩酸(pH7.2)、1mMのEDTA)1mlを加え、4℃で15000rpmで30分間遠心した。

【0054】

上記で得た細胞上清の蛋白質溶液(2mg/mlの溶液0.15ml)に、抗NADE抗体(1μg)および予めライシス緩衝液で平衡化したProtein Gセファロース(20μl; アマシャムファルマシア社)を加えた。

免疫沈降物を常法によりSDS-PAGE(12.5%ポリアクリルアミド、200Vで1時間)で分離し、ウエスタンブロッティングして得た膜に、一次抗体として抗14-3-3抗体(サンタクルズ社)、及び二次抗体としてBioRad社のセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgGおよびセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgGを4000倍に希釈したものを使用して、各々反応させ、ECL検出キット(アマシャムファルマシア社)を用いて検出した。

その結果、NADE cDNAを含む発現ベクターで形質転換した細胞由来の蛋白質抽出液の免疫沈降画分を抗14-3-3抗体と反応させたレーンに特異的なバンドが検出された。

【0055】

また同様に、マウス胚内部細胞塊由来のES細胞(D3)の細胞抽出物(内在性のNADEを含む)を用い、NADE抗体及びProtein Gセファロースを加え結合した蛋白分子を常法によりSDS-PAGE、ウエスタンブロッティングし、一次抗体として抗14-3-3抗体(サンタクルズ社)を使用し、二次抗体としてBioRad社のセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウスIgG、セイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgGを4000倍に希釈したものを使用し、ECL検出キット(アマシャムファルマシア社)を用いて検出した結果、特異的なバンドが検出された。

293T細胞並びにES細胞(D3)において14-3-3/NADEが複合体を形成していることが示された上記の結果から、インビボにおいても14-3-3/NADEが複合体を形成していることが示された。

【0056】

実施例4：NADE蛋白質とNIK/HGK蛋白質とのインビボにおける結合

ほ乳類培養細胞に発現させたNADE蛋白質がNIK/HGKと結合することを、実施例3と同様に免疫沈降実験により確認した。

293T細胞を一晩培養し、 $10\mu\text{g}/\text{プレート}$ のNADE発現用組み換えベクター（pCDNA3.1-NADE-MycHis）と $10\mu\text{g}/\text{プレート}$ のFLAGを連結した完全長のヒト由来NIK（HGK）を含む発現組み換えベクターを添加して、293T細胞を塩化カルシウム法により形質転換した。形質転換された細胞を回収、洗浄した後、細胞抽出物を調製した。細胞抽出物に抗FLAG抗体（1プレート分の細胞抽出物当たり $1\mu\text{g}$ の抗体を使用）とProtein Gセファロース（ $20\mu\text{l}$ 、アマシャムファルマシア社）を加えた。

【0057】

免疫沈降物を常法によりSDS-PAGE（10%ポリアクリルアミド、200Vで1時間）で分離し、ナイロン膜にウエスタンブロッティングした。膜を一次抗体溶液（ $1\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗NADE抗体）に浸して反応させ、洗浄後、二次抗体溶液（BioRad社のセイヨウワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギIgGを3000倍に希釈したもの）に浸して反応させ、以下、ECL法により検出した。

その結果、NADEcDNAを含む発現ベクターとFLAGを連結した完全長のNIK/HGKを含む発現組み換えベクターで形質転換した細胞由来の蛋白質抽出液の免疫沈降画分を一次抗体として抗NADE抗体を用いて検出した場合に特異的なバンドが検出された。この結果は、インビボにおいてもNIK/NADEが複合体を形成していることを示している。

【0058】

実施例5：神経細胞成長因子(NGF)によるNADE蛋白質と14-3-3蛋白質との結合の促進

NADE蛋白質と14-3-3蛋白質の結合が神経細胞成長因子(NGF)により促進されることを確認した。

先ず、無血清培地で12時間培養したPCNA細胞（70%コンフルエント、 $10\text{cm}$ プレート）を回収し、無血清培地 $9\text{ml}$ に懸濁し、NGFを最終濃度 $100\text{ng}/\text{ml}$ に

なるように添加し、2時間インキュベーションした後、細胞抽出物を調製した。細胞抽出物に抗N A D E抗体（ $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶液を $1 \mu\text{l}$ ）及びProteinGセファロース（ $10 \mu\text{l}$ 、アマシャムファルマシア社）を加えた。免疫沈降物をSDS-PAGEに付し、ウェスタンブロッティングし、一次抗体として抗14-3-3蛋白質抗体を用いて実施例3および4と同様に免疫沈降物を分析した結果、NGFの刺激に応じて14-3-3が検出された。

このことは、NGF/p75<sup>NTR</sup>複合体の情報伝達系に14-3-3/N A D E複合体の結合が関与していることを示している。

【0059】

【発明の効果】

本発明により、アポトーシスを調節する薬剤のデザインやスクリーニング系を構築することが可能となるとともに、アポトーシスの制御異常が原因となっておこる様々な神経系疾患に対して、従来には無い新しいタイプの治療薬の開発が期待される。

【0060】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Rikagaku Kenkyujo

<120> An agent for screening comprising an apoptosis related protein

<130>

<160> 2

<210> 1

<211> 29

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 1

atggatcctc atggccaatg tccaccagg 29

<210> 2

<211> 32

<212> DNA

<213> Synthetic DNA

<400> 2

atctcgagtc aaggcataag gcagaattca tc 32

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 NADE 結合蛋白質を同定すること。

【解決手段】 NADE (p 75<sup>NTR</sup>-associated cell death executor) と結合するアポトーシス関連蛋白質またはそれをコードするDNAから成る、アポトーシス関連疾患の治療、予防及び／又は診断用の医薬のスクリーニングに用いるための試薬。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000006792]

1. 変更年月日	1990年 8月28日
[変更理由]	新規登録
住 所	埼玉県和光市広沢2番1号
氏 名	理化学研究所



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599130494]

1. 変更年月日	1999年 9月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	東京都大田区仲池上2-1-1-303
氏 名	佐藤 孝明

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [599130508]

1. 変更年月日	1999年 9月14日
[変更理由]	新規登録
住 所	茨城県牛久市神谷2-41-15
氏 名	入江 新司